

Früherkennung alkoholbedingter Leberschäden:

Eine tierexperimentelle Studie zur Frage
der Gamma-Glutamyltransferase-Aktivitätserhöhung
im Serum durch mikrosomale Enzyminduktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

1980

vorgelegt von
Angelika Brand

1979

Früherkennung alkoholbedingter Leberschäden:

Eine tierexperimentelle Studie zur Frage
der Gamma-Glutamyltransferase-Aktivitätserhöhung
im Serum durch mikrosomale Enzyminduktion



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Angelika Brand



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H. L. Krüskemper

Referent

gez.: Prof. Dr. G. Strohmeier

Korreferent

gez.: Prof. Dr. F. K. Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	2
<u>2. Material und Methoden</u>	4
2.1. Material	4
2.2. Patientengut	5
2.3. Tiere	6
2.3.1. Chronische Alkoholfütterung	7
2.3.2. Extrahepatische Gallengangs- unterbindung	9
2.3.3. Gewinnung von Serum und Zell- fraktionen der Leber	10
2.4. Biochemische Bestimmungsmethoden	12
<u>3. Ergebnisse</u>	
3.1. Gamma-Glutamyltransferase-Aktivität nach chronischem Alkoholkonsum	16
3.1.1. Studie am Menschen	16
3.1.2. Tierexperimentelle Untersuchungen	16
3.2. Gamma-Glutamyltransferase-Aktivität nach extrahepatischer Gallengangsunterbindung	30
<u>4. Diskussion</u>	37
<u>5. Zusammenfassung</u>	45
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	47

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
CHE	Cholinesterase
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LAP	Leucin-Aminopeptidase
5'ND	5'Nucleotidase

1. Einleitung

Die Gamma-Glutamyltransferase (GGT) ist seit 1950 in der Literatur bekannt (20), fand aber erst im letzten Jahrzehnt breites Interesse im Rahmen der klinischen Diagnostik (49). Nach der Entwicklung einer einfachen kinetisch-photometrischen Bestimmungsmethode wurde die GGT-Aktivität im Serum bei Erkrankungen verschiedener Organe untersucht. So konnte gezeigt werden, daß vornehmlich hepatobiliäre Erkrankungen mit einer Erhöhung der GGT-Aktivität einhergingen (50). Andererseits wurden keine entsprechenden Aktivitätserhöhungen der GGT im Serum bei pathologischen Veränderungen beispielsweise der Nieren oder der Bauchspeicheldrüse gefunden (1, 36, 47, 51), obwohl diese Organe eine wesentlich höhere spezifische Aktivität der GGT aufweisen als die Leber (17). Es wird allgemein angenommen, daß die GGT-Aktivität im Serum praktisch ausschließlich aus der Leber stammt (25, 44, 47). Der histochemische Nachweis dieses Enzyms in der Leber gelang sowohl beim Menschen (16) als auch bei verschiedenen Tierarten (28). Bemerkenswert ist dabei, daß es neben einer membran-gebundenen Form auch eine lösliche Form der GGT gibt, die sich durch ein niedrigeres Molekulargewicht auszeichnet und in Körperflüssigkeiten vorkommt (39, 53, 54).

Erhöhungen der Serum-GGT-Aktivitäten wurden bei zahlreichen hepatobiliären Erkrankungen nachgewiesen einschließlich Cholestase (34, 50), biliärer Zirrhose (48), raumfordernden Prozessen der Leber (34, 41), toxisch bedingten Leberschäden beispielsweise durch halogenierte Kohlenwasserstoffe (46) sowie bei der therapeutischen Anwendung verschiedener Substanzen wie Tuberkulostatika, Antikonvulsiva und oraler Antikonzeptiva (36) und schließlich insbesondere bei alkoholischen Leberschäden (42, 44, 58).

Alkoholbedingte Leberveränderungen gehen häufig mit einer extremen Erhöhung der GGT-Aktivität im Serum einher (58). Um den Pathomechanismus der erhöhten GGT-Aktivität abzuklären, wurde bei Patienten mit einer histologisch gesicherten alkoholischen Fettleber die Aktivität dieses Enzyms im Serum mit derjenigen verschiedener anderer typischer Leberenzyme im Serum verglichen. Von besonderer Bedeutung war die Frage, ob die Erhöhung der GGT-Aktivität im Serum auf einen vermehrten Austritt des Enzyms aus der Leber infolge einer Leberzellschädigung zurückzuführen ist, oder ob es unter Alkoholeinfluß zu einer gesteigerten Produktion des Enzyms in der Leber kommt. In tierexperimentellen Studien wurden daher Tiere chronisch mit Alkohol gefüttert und die Aktivitäten der GGT sowohl im Serum als auch direkt in der Leber und in zahlreichen biochemisch definierten Zellkompartimenten untersucht und miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden

Firmen bezogen :

GGT Monotest (Nr. 15885), GOT UV-Test, optimierte Standardmethode (Nr. 15766), GPT UV-Test, optimierte Standardmethode (Nr. 15767), LAP 3-Min-Methode (Nr. 15952), AP, optimierte Standardmethode (Nr. 15718), CHE Monotest mit Butyrylthiocholin als Substrat (Nr. 124125), Triglyceride vollenzymatisch (Neutralfett)(Nr. 15395), Triglyceride Ingo-Test (Nr. 567651), Gesamteiweiß Biuret-Methode (Nr. 15899) und β -NADH von Boehringer Mannheim, Mannheim ;
4-Aminobenzoessäure, Biotin, Bilirubin (zur Analyse), Ca-D(+)-Panthothenat, Cholinchlorid, DL-Methionin, DL- α -Tocopherolacetat, Folsäure, Inosit, L-Cystin, Menadion, Nicotinsäureamid, Pyridoxolhydrochlorid, Riboflavin, Thiamindichlorid, Vitamin-A-acetat (als öliges Konzentrat), Vitamin B₁₂, Vitamin D₂ (in ölliger Lösung), Natriumdesoxycholat und Natriumdithionit von Merck, Darmstadt; Linolsäureäthylester von Roth, Karlsruhe; Casein (vitaminfrei) von Serva, Heidelberg; Dextromed und Malto-Dextrin 19 von Maizena, Heilbronn; Carrageenate und der 5'Nucleotidase-Test von Sigma Chemical Corporation, St. Louis, USA.

2.2. Patientengut

Untersucht wurden insgesamt 19 Patienten (5 ♀; 14 ♂) der Medizinischen Klinik D der Universität Düsseldorf, bei denen die histologische Untersuchung der Leber anlässlich einer Leberblindpunktion oder Laparaskopie eine alkoholische Fettleber ergab. Bei diesen Patienten wurden Serumaktivitäten der GGT sowie anderer Leberenzyme wie GOT, GPT, AP und LAP bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die Normwerte sämtlicher Leberwerte im Serum aufwiesen.

2.3. Tiere

Weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 100-150 g wurden als Geschwisterpaare vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, bezogen. Die Tiere wurden in einem Temperatur-kontrollierten Raum gehalten und erhielten vor dem Experiment Altrumin-R-Trockenfutter und Leitungswasser ad libitum. Für die einzelnen Versuche wurden sie in Paare geteilt und in Einzelkäfige gesetzt.

2.3.1. Chronische Alkoholfütterung

Während einer Versuchsdauer von 4-5 Wochen erhielten die Ratten eine spezielle Flüssigdiät als einzige Quelle von Nahrung und Wasser (D e C a r l i und L i e b e r , 1967). Dies ist eine ernährungsmäßig vollwertige Diät, die bei der Alkoholgruppe Äthanol (36 % der gesamten Kalorien) und bei der Kontrollgruppe statt Äthanol zusätzlich isokalorische Kohlenhydrate (Malto-Dextrin) enthielt (Tabelle 1). Der Anteil an Casein, angereichert mit Methionin und Cystin, betrug 18 % der gesamten Kalorien. Fette wurden in einer Mischung aus Oliven- und Maisöl (33 % der gesamten Kalorien) versehen mit Linolsäureäthylester (2 % der gesamten Kalorien) gegeben. Die Diät enthielt etwa 1 kcal/l. Die Ratten wurden paarweise gefüttert, wobei der Verbrauch der Futtermenge des Alkoholtieres die Futtermenge des Kontrolltieres für den nächsten Tag bestimmte. So wurde eine isokalorische Nahrungsaufnahme beider Gruppen gewährleistet. Zur allmählichen Gewöhnung der Tiere an die Endkonzentration von 50 g Äthanol/l Flüssigdiät erhielten sie an den ersten beiden Tagen nur 30 g Alkohol/l und anschließend 40 g Alkohol/l für zwei weitere Tage, bevor die übliche Alkoholdiät mit 50 g Alkohol/l Diät verabreicht wurde.

Tabelle 1

Zusammensetzung der flüssigen Alkohol- und Kontroll-Diät

Die Diäten wurden nach DeCarli und Lieber, 1967, zubereitet und enthielten in 1 Liter folgende Bestandteile:

Substanzen	Mengen
Casein	41,4 g
L-Cystin	0,5 g
DL-Methionin	0,3 g
Vitaminmischung ⁽⁺⁾	5,0 g
Salzmischung Hegsted	10,0 g
Maisöl	8,5 g
Olivöl	28,5 g
Linolsäureäthylester	2,7 g
Vitamin-A-Acetat	2,0 g
Calciferol	0,01 mg
DL- α -Tocopherolacetat	30,0 mg
Malto-Dextrin	150,9 g ⁽⁺⁺⁾
Carrageenate	2,5 g
Aqua dest. auffüllen auf	1,0 l

⁽⁺⁾Vitaminmischung, Bestandteile in mg : Thiamin 0,725; Riboflavin 1,25; Pyridoxol-HCl 0,725; Ca-Pantothenat 5,0; Nicotinsäureamid 3,75; Cholinchlorid 250,0; Biotin 0,025; Folsäure 0,25; Inositol 25,0; Menadion 0,25; Vitamin B₁₂ 0,025; p-Aminobenzoessäure 12,5 und Glukose 4700,5.

⁽⁺⁺⁾Malto-Dextrin wurde bei der Alkoholdiät durch 49,7 g Maltodextrin und 50,0 g absoluten Äthylalkohol ersetzt.

2.3.2. Extrahepatische Gallengangsunterbindung

Unter leichter Äthernarkose wurde eine extrahepatische Cholestase durch zweifache Unterbindung und anschließender Durchtrennung des Gallengangs erzeugt. Als Kontrollgruppe dienten Ratten, bei denen eine Scheinoperation ohne Unterbindung des Gallenganges durchgeführt wurde. Untersucht wurden 12 weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 180-200 g.

2.3.3. Gewinnung von Serum und Zellfraktionen der Leber

Nach Dekapitation der Ratten wurde das Blut aus den Halsgefäßen mittels eines Trichters in einem Zentrifugenglas aufgefangen, nach etwa 30 Minuten zentrifugiert und das Serum zur Bestimmung von Enzymaktivitäten gewonnen. Die Rattenlebern wurden in situ mit eisgekühlter 0,15 M Kaliumchlorid-Lösung über die Pfortader her perfundiert, stumpf herauspräpariert, von Blutgerinnseln befreit, gewogen und in einem dreifachen Volumen von eisgekühlter 0,15 M Kaliumchlorid-Lösung homogenisiert. Als Homogenisator wurde der Potter S der Firma Braun, Melsungen, im Drehzahlbereich 1500 Upm, Teflonkolben und markierte Homogenisationsgefäße benutzt. Alle weiteren präparativen Schritte erfolgten bei 0-4°C. Die verschiedenen subzellulären Kompartimente der Leberzelle wurden wie früher beschrieben in Anlehnung an die Methode von K a t o (1966) präpariert (T e s c h k e, H a s u m u r a und L i e b e r ,1975). Das 25%-ige Leberhomogenat wurde 30 Minuten lang bei 10,000 g in der Kühlzentrifuge Sorvall Superspeed RC 2 B , der resultierende Überstand bei 105,000 g in der Ultrazentrifuge L 5-50, Firma Beckman, München, mit dem Rotor 60 Ti für weitere 30 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde nochmals 30 Minuten lang bei 105,000 g zentrifugiert und die Fraktion des Leberzellplasmas (Cytosol) gewonnen. Der nach der ersten Zentrifugation bei 105,000 g erhaltene Niederschlag entsprach

der Fraktion von ungewaschenen Mikrosomen. Diese wurden in 0,15 M Kaliumchlorid-Lösung aufgenommen und nochmals bei 105,000 g zentrifugiert. Der jetzt gewonnene Niederschlag enthielt gewaschene Mikrosomen und wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) auf eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml eingestellt. Das Cytochrom P-450 wurde im Leberhomogenat nach der Methode von G r e i m und Mitarbeitern (1970) mittels eines Spektralphotometers gemessen und in nMol/g Leber Feuchtgewicht ausgedrückt. Die Bestimmung des Cytochroms in Lebermikrosomen erfolgte nach der Methode von O m u r a und S a t o (1964). Der Gehalt wurde in nMol/mg Protein ausgedrückt. Mit Hilfe der Cytochrom P-450-Bestimmung im Leberhomogenat und in den Mikrosomen konnte die Wiederfindung von Mikrosomen während der Mikrosomenpräparation bestimmt werden (18).

2.4. Biochemische Bestimmungsmethoden

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, (GOT ; EC 2.6.1.1), optimierte Standardmethode nach B e r g m e y e r und B e r n t , 1974. Zur GOT Bestimmung läßt man das zu untersuchende Material in gepufferter Lösung auf Ketoglutarat und Aspartat einwirken. Das entstehende Oxalacetat wird enzymatisch in Gegenwart von Malatdehydrogenase durch NADH_2 zu Malat umgesetzt. Die Geschwindigkeit des NADH_2 -Verbrauchs kann durch die Extinktionsabnahme im nahen UV-Bereich bei 366 nm gemessen werden. Sie ist der GOT Aktivität direkt proportional.

Glutamat-Pyruvat-Transaminasen, (GPT ; EC 2.6.1.2), Methode nach B e r g m e y e r und B e r n t , 1970. Bei dieser Bestimmung läßt man das zu untersuchende Material in gepufferter Lösung auf Ketoglutarat und L-Alanin einwirken. Das entstehende Pyruvat wird enzymatisch in Gegenwart von Lactatdehydrogenase durch NADH_2 zu Lactat umgesetzt. Die Geschwindigkeit des NADH_2 -Verbrauchs kann durch die Extinktionsänderung bei 366 nm gemessen werden. Sie ist der GPT Aktivität proportional.

Alkalische Phosphatase, (AP ; EC 3.1.3.1), optimierte Standardmethode nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1970 und 1972, in Anlehnung an die Methode von H a u s a m e n und Mitarbeiter, 1967. Bei dieser Methode wird p-Nitrophenylphosphat durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenol-Menge ist proportional der Phosphatase Aktivität und kann bei 405 nm bestimmt werden.

Leucinaminopeptidase, (LAP ; EC 3.4.11.1), Methode nach N a g e l , W i l l i g und S c h m i d t , 1964. Die LAP katalysiert die hydrolytische Spaltung von Aminosäurearylamiden. Bei dieser Methode wird das Substrat Leucin-p-nitroanilid in Leucin und in das bei 405 nm absorbierende 4-Nitranilin gespalten. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist der Geschwindigkeit der Substratspaltung und damit der Enzymaktivität proportional.

Gamma-Glutamyltransferase, (GGT ; EC 2.3.2.2), nach S z a s z , 1969. Die GGT überträgt den Glutamyl-Rest von γ -Glutamyl-p-nitranilid auf Glycylglycin. Das dabei freigesetzte p-Nitroanilin ist proportional der GGT-Aktivität. Die Extinktionszunahme kann bei 405 nm gemessen werden.

Die Aktivität der GGT in der Leber wurde mit einem Zusatz von 1 mg Desoxycholat pro Ansatz (Endvolumen 3,01 ml) bestimmt.

Cholinesterase, (CHE ; EC 3.1.1.8), Methode nach K n e d e l und B ö t t g e r , 1967. Das Enzym CHE spaltet Butyrylthiocholin in Butyrat und Thiocholin. Man bestimmt die Aktivität der CHE aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen Zunahme an Thiocholin. Thiocholin reagiert mit Dithio-bisnitrobenzoat unter Bildung von 2-Nitro-5-mercaptobenzoat, dessen Farbintensität bei 405 nm gemessen wird.

Triglyceride (Neutralfett), Methode nach W a h l e f e l d , 1974, vollenzymatische Bestimmung der Triglycerid-Konzentration im Serum über den Glycerin-gehalt. Aus Triglyceriden wird nach der Verseifung das entstandene Glycerin in der durch Glycerokinase katalysierten Reaktion durch ATP zu Glycerin-1-Phosphat phosphoryliert. Nach weiteren Reaktionsschritten,

die durch Pyruvatkinase und LDH katalysiert werden, wird die Abnahme der NADH_2 -Konzentration bestimmt, die der Triglycerid-Konzentration proportional ist.

Triglyceride, Ingo-Test, Acetylacetonmethode (29).

Zur Bestimmung im Lebergewebe werden die Triglyceride nach Abtrennung von den Phosphatiden durch Extraktion gemessen.

Gesamt-Eiweiß, Biuret-Methode nach den Angaben von W e i c h s e l b a u m, 1946. Bei dieser Bestimmung wird der von Eiweiß in alkalischer Lösung mit Kupfer-Ionen gebildete blaviolett gefärbte Komplex, dessen Farbintensität der Eiweißkonzentration proportional ist, bei 546 nm gemessen.

Cytochrom P-450, Methode von O m u r a und S a t o, 1964. Nach Reduktion mit Dithionit bindet Cytochrom P-450 Kohlenmonoxyd. Die CO-Komponente des reduzierten Pigmentes P-450 hat einen extrem hohen Absorptionspeak bei 450 nm, welcher durch wiederholte Messungen bei 450 bis 490 nm in der Mikrosomenfraktion der Leberzelle bestimmt werden kann.

Das Cytochrom P-450 wurde im Leberhomogenat in Anlehnung an die Methode von G r e i m und Mitarbeiter, 1970, gemessen.

5'Nucleotidase (5'ND), Methode nach D i x o n und P u r d o m, 1954. Die Meßgröße dieser Bestimmung ist die Menge an anorganischem Phosphor, die bei der durch 5'ND katalysierten Hydrolyse von Adenosin-5-Monophosphat (AMP) entsteht und bei 620 bis 700 nm gemessen wird.

Die photometrischen Tests wurden mit dem Spektral-
photometer PM 6 der Firma Zeiss, Oberkochen, und dem
linearen Potentiometerschreiber Servogor RS der Firma
Metrawatt GmbH, Nürnberg, aufgezeichnet. Für die
Bestimmung des Cytochrom P-450 benutzten wir das
Spektralphotometer Unicam SP 1800 und den Unicam AR 25
Linear Recorder, Cambridge, England.

Alle Bestimmungen erfolgten bei 25°C ; die Aktivität
der Enzyme wurde als Units/l bzw. pro g Leber Feucht-
gewicht, pro g Eiweiß und pro 100 g Körpergewicht
berechnet. Sämtliche Untersuchungen wurden in Doppel-
bestimmungen durchgeführt. Aus den Einzeldaten wurden
der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittel-
werts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) berechnet. Die Mittelwertsdifferenzen
wurden nach S t u d e n t analysiert und p-Werte < 0,05
als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. GGT Aktivität bei chronischem Alkoholkonsum

3.1.1. Studie am Menschen

Bei Patienten mit einer histologisch gesicherten alkoholischen Fettleber fand sich eine ausgeprägte Erhöhung der GGT Aktivität im Serum im Vergleich zum Normbereich. Im Gegensatz dazu sind andere Serumenzyme wie die Transaminasen, die LAP oder AP in ihrer Aktivität, wenn überhaupt, dann nur geringfügig erhöht (Abb. 1).

3.1.2. Tierexperimentelle Untersuchungen

Um den Pathomechanismus der GGT-Aktivitätserhöhung im Serum nach chronischem Alkoholkonsum abzuklären, wurde im Tierexperiment das Verhalten der GGT in der Leber untersucht. Dabei wurden Ratten während einer Versuchsdauer von 4-5 Wochen mit der alkoholhaltigen Diät ernährt, während bei der Kontrolldiät der Alkohol isokalorisch durch zusätzliche Kohlenhydrate ersetzt wurde. Die alkoholgefütterten Tiere nahmen in der ersten Woche durchschnittlich 28 kcal, in der zweiten 38,5 kcal, in der dritten Woche 55 und in den letzten beiden Wochen 99,8 kcal/Tier/Tag zu sich. Nach chronischem Alkoholgenuß nahmen die Tiere ebenso wie nach

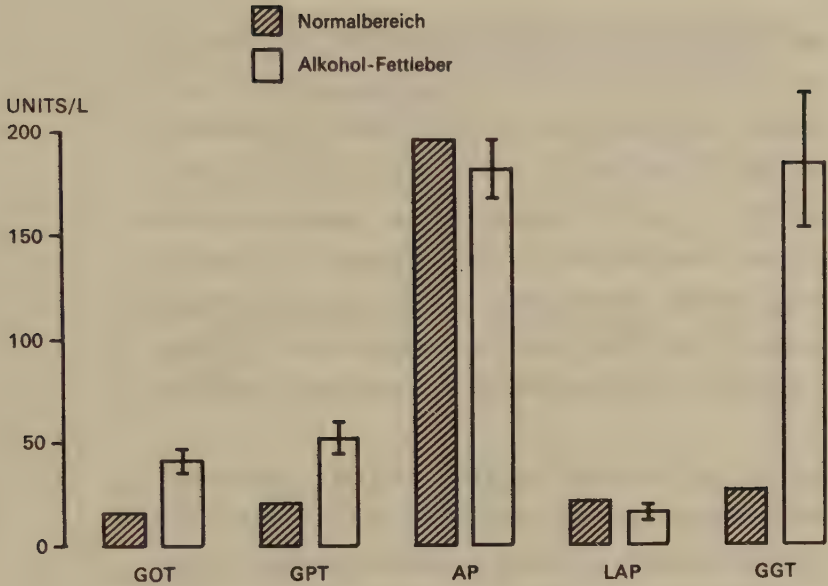


Abb. 1 : Serumaktivitäten verschiedener Enzyme bei
alkoholischer Fettleber

Die Serumaktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), alkalischen Phosphatase (AP), Leucinaminopeptidase (LAP) und der Gamma-Glutamyltransferase (GGT) bei Patienten (n=19) mit einer histologisch gesicherten alkoholischen Fettleber im Vergleich zum Normalbereich.

der Kontrollldiät ständig an Gewicht zu. So stieg bei den alkoholgefütterten Ratten das Körpergewicht von anfangs 110 ± 12 g auf 156 ± 7 g gegen Versuchsende, bei den Kontrollratten von 107 ± 5 g Körpergewicht auf 188 ± 6 g. Das Lebergewicht war ebenso nach chronischem Alkoholkonsum deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Lebergewicht bei der alkoholgefütterten Gruppe : $4,46 \pm 0,16$ g/100 g Körpergewicht vs. $3,93 \pm 0,12$ g/100 g Körpergewicht bei der Kontrollgruppe).

Ähnlich wie beim Menschen (Abb. 1) führt chronischer Alkoholkonsum während einer Dauer von 4-5 Wochen auch tierexperimentell zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg der Serum-GGT auf das Dreifache der Werte im Vergleich zu den mit der Kontrollldiät gefütterten Tieren (Tab.2). Die Cholinesterase zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Serumaktivität, während die anderen Enzyme keine signifikanten Unterschiede in ihren Aktivitäten aufwiesen (Tab.2). Es stellte sich somit die Frage, ob die Steigerung der GGT-Aktivität im Serum primär auf einen Leberzellschaden mit einer gesteigerten Enzymausschüttung oder auf eine erhöhte Enzymproduktion in der Leber zurückzuführen ist.

Parallel zum Anstieg der GGT-Aktivität im Serum fand sich in der Leber der alkoholgefütterten Ratten eine um 60 % signifikant erhöhte GGT-Aktivität, wenn die

Tabelle 2 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Serum der Ratte.

Die Enzymaktivitäten sind in Units/l Serum angegeben und beziehen sich auf insgesamt 12 Versuchstiere.

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
GGT (U/l)	1,11 $\pm$ 0,53	3,87 $\pm$ 0,40	<0,01
GOT (U/l)	168 $\pm$ 25	168 $\pm$ 16	N.S.
GPT (U/l)	79,4 $\pm$ 17	73,3 $\pm$ 3,4	N.S.
AP (U/l)	98,3 $\pm$ 16	119,0 $\pm$ 14	N.S.
LAP (U/l)	27,6 $\pm$ 2,8	28,8 $\pm$ 4,1	N.S.
CHE (U/l)	238 $\pm$ 22	494 $\pm$ 83	<0,05
Triglyceride (mg %)	102 $\pm$ 25	157 $\pm$ 40	N.S.

Aktivität auf g Leber (Feuchtgewicht) bezogen wurde (Tab.3). Ähnliche Resultate ergaben sich, wenn die Leberenzymaktivitäten auf g Lebereiweiß berechnet wurden (Tab.3). Die Aktivitätserhöhung pro g Eiweiß deutet dabei auf eine durch Alkoholaufnahme bedingte Enzyminduktion der GGT in der Leber hin. Die Triglyceride, die GPT und die CHE waren ebenfalls signifikant erhöht (Tab.4).

Da chronischer Alkoholkonsum im Serum und in der Leber eine Steigerung der GGT-Aktivität hervorruft (Tab.2 und 3), erhob sich die Frage nach der intrazellulären Lokalisation der GGT. Daher wurde die Aktivität dieses Enzyms in verschiedenen Zellkompartimenten untersucht. Bereits im 10 000 x g - Überstand, dem Kompartiment von vorwiegend zytoplasmatischen und mikrosomalen Enzymen, war die GGT geringgradig erhöht ohne daß allerdings die Unterschiede den Grad der Signifikanz erreichten (Tab. 5). Während die Leucinaminopeptidase-Aktivität der Alkohol-gefütterten Gruppe sich in diesem Kompartiment nicht wesentlich von der Kontrollgruppe unterschied, zeigte sich, daß die alkalische Phosphatase und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase eine signifikant höhere Aktivität bei den alkoholgefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwies. Nach Zentrifugation bei 100 000 x g war im Überstand, dem Zytosol der Leberzelle, eine geringe Aktivität der GGT zu finden (Tab. 6). Zwischen beiden Tiergruppen zeigten sich

Tabelle 3 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung
auf die GGT Aktivität im Leberhomogenat der
Ratte.

Die Enzymaktivität ist in Units pro g Leber
Feuchtgewicht, pro g Eiweiß und pro 100 g
Körpergewicht berechnet. Untersucht wurden
insgesamt 12 Tiere.

G a m m a - G l u t a m y l t r a n s f e r a s e

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
U/g Leber	0,35 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,10	<0,05
U/g Eiweiß	2,36 $\pm$ 0,45	4,11 $\pm$ 0,53	<0,025
U/100g KG	1,37 $\pm$ 0,15	2,51 $\pm$ 0,56	<0,05

Tabelle 4 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Leberhomogenat der Ratte .

Alle Enzymaktivitäten sind in Units pro g Leber Feuchtwicht berechnet. Die Ergebnisse stammen von 12 Versuchstieren.

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
GOT	108,0 $\pm$ 0,03	117,0 $\pm$ 12,0	N.S.
GPT	29,5 $\pm$ 3,7	45,2 $\pm$ 6,9	< 0,025
AP	0,50 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,04	N.S.
LAP	0,65 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,06	N.S.
CHE	2,65 $\pm$ 0,28	3,25 $\pm$ 0,24	< 0,05
Trigly- ceride (mg%)	70,0 $\pm$ 5,0	89,9 $\pm$ 6,6	< 0,025

Tabelle 5 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme in Rattenlebern.

Die Aktivitäten im 10 000 x g -Überstand sind in Units pro g Leber Feuchtgewicht, bei der GGT zusätzlich in Units pro g Eiweiß angegeben und beziehen sich auf insgesamt 12 Versuchstiere.

10 000 x g - Überstand

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
GGT (U/g Leber)	0,25 ± 0,03	0,29 ± 0,02	N.S.
GGT (U/g Eiweiß)	3,31 ± 0,58	3,07 ± 0,27	N.S.
GPT (U/g Leber)	22,0 ± 1,9	32,3 ± 4,9	<0,025
AP (U/g Leber)	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,04	<0,025
LAP (U/g Leber)	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	N.S.

Tabelle 6 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme in Rattenlebern.

Die Aktivitäten im 100 000 x g - Überstand (= Cytosol) sind in Units pro g Leber Feuchtgewicht; bei der GGT zusätzlich pro g Eiweiß berechnet. Untersucht wurden insgesamt 12 Versuchstiere.

100 000 x g - Überstand

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
GGT (U/g Leber)	0,040 $\pm$ 0,008	0,053 $\pm$ 0,013	<0,05
GGT (U/g Eiweiß)	1,10 $\pm$ 0,39	1,48 $\pm$ 0,70	N.S.
GPT (U/g Leber)	19,8 $\pm$ 2,5	30,1 $\pm$ 6,1	<0,05
AP (U/g Leber)	0,10 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	<0,025
LAP (U/g Leber)	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	N.S.

nur geringe Unterschiede bei der Gamma-Glutamyltransferase-Aktivität, während die Glutamat-Pyruvat-Transaminase und die alkalische Phosphatase ausgeprägte Aktivitätserhöhungen von 52 % und 90 % aufwiesen (Tab.6). Demgegenüber war die Aktivität der Leucinaminopeptidase in dieser Fraktion bei den alkoholgefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert (Tab.6).

In den Lebermikrosomen, die nach zweimaliger Zentrifugation bei 105,000 g als Sediment erhalten wurden, konnte eine signifikant gesteigerte GGT-Aktivität bei den alkoholgefütterten Tieren gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden (Tab.7). Die mikrosomale Aktivität pro g Leber (Feuchtgewicht) und pro 100 g Körpergewicht wurde entsprechend der jeweiligen Mikrosomenausbeute, die bei der Alkoholgruppe 78 % und bei der Kontrollgruppe 51 % betrug, nach der Methode von G r e i m (1970) korrigiert. Durch die Bestimmung der 5'-Nucleotidase (5'-Ribonucleotid Phosphohydrolase, EC 3.1.3.5), einem charakteristischen Enzym der Plasmamembranen (7, 29), sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Mikrosomenfraktion durch Plasmamembranen verunreinigt war. Von 100 % ihrer Gesamtaktivität im Leberhomogenat ausgehend fand sich lediglich 2,5 % in der Mikrosomenfraktion.

Da die GGT-Aktivität sowohl pro g Eiweiß als auch pro g Leber (Feuchtgewicht), wenn man den durch die Präparation bedingten Verlust berücksichtigt, und pro 100 g

Tabelle 7 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme in Lebermikrosomen von Ratten.

Die Aktivitäten wurden in Lebermikrosomen, dem 100 000 x g - Niederschlag der Leberzellen, bei 12 Rattenlebern untersucht, um den durch die Präparation bedingten Verlust korrigiert und in Units pro g Leber Feuchtgewicht nach der Methode von G r e i m , 1970, berechnet. Bei der GGT sind die Aktivitäten zusätzlich in Units pro g mikrosomales Eiweiß und in Units pro 100 g Körpergewicht angegeben.

M i k r o s o m e n

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
GGT (U/g Eiweiß)	2,96 $\pm$ 0,54	4,34 $\pm$ 0,44	< 0,01
GGT (U/g Leber)	0,10 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	< 0,025
GGT (U/100 g KG)	0,34 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,06	< 0,025
AP (U/g Leber)	0,22 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03	< 0,025
LAP (U/g Leber)	0,13 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,014	N.S.

Körpergewicht signifikant erhöht war (Tab. 7), handelt es sich um eine echte Enzyminduktion in der Leber. Im Sinne einer mikrosomalen Enzyminduktion kann auch der erhöhte Gehalt des mikrosomalen Cytochrom P-450 und des mikrosomalen Proteins angesehen werden, der nach chronischem Alkoholkonsum nachweisbar war (Tab. 8).

Da die in vivo Applikation von Alkohol eine Enzyminduktion auslöste, untersuchten wir in einem erneuten Experiment die Wirkung des Alkohols in vitro auf die mikrosomale GGT. Die Aktivität der mikrosomalen GGT wurde nach Zugabe von Äthanol (50 mM) oder Desoxycholat (1 mg/Ansatz) gemessen und mit Kontrollinkubationen verglichen, in denen statt Äthanol oder Desoxycholat physiologische Kochsalzlösung zugesetzt worden war. Unter diesen Versuchsbedingungen bewirkte die in vitro Zugabe von Alkohol einen geringen Anstieg der GGT-Aktivität in den Lebermikrosomen der alkoholgefütterten Tiere, nicht aber in den Mikrosomen der Kontrolltiere (Tab. 9). Eine ausgeprägte Steigerung der mikrosomalen GGT-Aktivität wurde in beiden Gruppen gefunden, wenn Alkohol durch Desoxycholat ersetzt wurde. Diese Befunde deuten auf eine mögliche Solubilisierung der mikrosomalen GGT-Aktivität hin, wobei dieser Effekt insbesondere nach chronischem Alkoholkonsum eine Rolle spielen dürfte.

Tabelle 8 : Einfluß einer chronischen Alkoholfütterung auf die Konzentration von Gesamteiweiß und den Cytochrom P-450-Gehalt der Rattenleber.
Das Gesamteiweiß ist in g/g Leber Feuchtgewicht und g/100 g Körpergewicht bzw. mg/g Leber und mg/100 g KG angegeben, das Cytochrom P-450 in nMol/g Leber, nMol/mg mikrosomales Eiweiß und nMol/100 g KG . Die Ergebnisse stammen von insgesamt 12 Tieren.

	Kontrollgruppe	Alkoholgruppe	p
<u>CytochromP450</u>			
Homogenat:			
(nMol/g Leber)	20,40 $\pm$ 3,45	35,68 $\pm$ 5,10	<0,025
(nMol/100gKG)	79,41 $\pm$ 11,10	159,18 $\pm$ 22,37	<0,025
Mikrosomen :			
(nMol/g Leber)	10,82 $\pm$ 2,18	28,23 $\pm$ 6,12	<0,025
(nMol/mg Eiw.)	0,81 $\pm$ 0,09	1,66 $\pm$ 0,24	<0,025
(nMol/100gKG)	41,18 $\pm$ 7,52	124,62 $\pm$ 24,97	<0,025
<u>Gesamt-Eiweiß</u>			
Homogenat :			
(g/g Leber)	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	N.S.
(g/100g KG)	0,62 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,08	N.S.
Mikrosomen :			
(mg/g Leber)	12,62 $\pm$ 1,56	16,34 $\pm$ 1,49	<0,025
(mg/100g KG)	48,68 $\pm$ 11,84	72,66 $\pm$ 16,66	<0,025

Tabelle 9 : Einfluß einer in vitro Zugabe von Äthanol oder Desoxycholat auf die Aktivität der mikrosomalen Gamma-Glutamyltransferase

Gewaschenen Lebermikrosomen wurden von 12 Ratten präpariert, die 4-5 Wochen lang entweder die Alkohol- oder die Kontroll-Diät erhielten. Die Aktivität der mikrosomalen GGT wurde nach Zugabe von Äthanol (50 mM Endkonzentration) oder von Desoxycholat (1 mg/Ansatz) gemessen und mit Kontrollinkubationen verglichen, in denen statt Äthanol oder Desoxycholat physiologische Kochsalzlösung zugesetzt worden war. Die Ergebnisse sind in Units/g mikrosomales Eiweiß angegeben und sind Mittelwerte von 6 Experimenten.

<u>Mikrosomale GGT Aktivität</u>		
Inkubationsbedingungen	Kontrollratte	Alkohol- gefütterte Ratte
Keine Zugabe	2,68	3,32
+ Äthanol	2,63	3,67
+ Desoxycholat	3,61	4,47

3.2. GGT Aktivität nach extrahepatischer Gallengangs- unterbindung

Ähnlich wie bei den Befunden nach chronischem Alkoholkonsum (Tab. 7) fand sich auch drei Tage nach extrahepatischer Gallengangsunterbindung ein Anstieg der mikrosomalen GGT pro g Eiweiß, pro g Leber und pro 100 g Körpergewicht (Tab. 10). Ebenso war die Serum-GGT-Aktivität der operierten Tiere signifikant erhöht. So betrug die GGT-Aktivität bei den scheinoperierten Ratten im Serum $0,28 \pm 0,28$ Units/l und bei den gallengangsunterbundenen Ratten $13,5 \pm 2,6$ Units/l ($p < 0,025$). Das Verhalten der GGT-Aktivität bei Cholestase war somit vergleichbar mit dem nach chronischem Alkoholkonsum beobachteten Effekt (Tab. 2 und 7). Demgegenüber unterschied sich das Serum-Enzym-Muster bei beiden Experimenten jedoch deutlich voneinander: bei der experimentellen Gallengangsunterbindung waren außer der GGT ebenfalls andere Cholestase-anzeigende Enzyme wie die alkalische Phosphatase und die Leucin-aminopeptidase in den ikterischen Seren erhöht (Tab. 11), während diese Enzyme nach Verabreichung von Alkohol im Rattenserum keine signifikant gesteigerte Aktivität zeigten (Tab. 2). Neben diesen Beobachtungen zeigten auch das mikrosomale Cytochrom P-450 und das Gesamteiweiß ein unterschiedliches Verhalten bei beiden Experimenten. Während das mikrosomale Cytochrom P-450

Tabelle 10 : Einfluß der extrahepatischen Gallengangsunterbindung auf die Aktivität der GGT im Zellplasma und Mikrosomen der Leber.

Die Enzymaktivitäten sind in Units/g Leber Feuchtgewicht, U/g Eiweiß und U/100 g Körpergewicht angegeben. Insgesamt wurden 12 Tiere untersucht.

Gamma-Glutamyltransferase

Leberzellplasma

	Kontrollratte	Gallengangs- unterbundene Ratte	p
U/g Leber	0,023 $\pm$ 0,001	0,026 $\pm$ 0,004	<0,025
U/g Eiweiß	0,38 $\pm$ 0,041	0,47 $\pm$ 0,69	<0,05
U/100 g KG	0,11 $\pm$ 0,016	0,15 $\pm$ 0,022	<0,025

Mikrosomen

U/g Leber	0,22 $\pm$ 0,062	0,26 $\pm$ 0,017	<0,025
U/mg Eiweiß	6,90 $\pm$ 1,29	9,41 $\pm$ 0,69	<0,025
U/100 g KG	1,09 $\pm$ 0,33	1,49 $\pm$ 0,11	<0,025

Tabelle 11 : Einfluß der extrahepatischen Gallengangs-
unterbindung auf die GGT-Aktivität und die
Aktivitäten verschiedener Serumenzyme der
Ratte.

Die Enzymaktivitäten sind in Units/l Serum
angegeben und stammen von insgesamt 12
Versuchstieren.

Serum

	Kontrollgruppe	Gallengangs- unterbundene Gruppe	p
GGT	0,28 $\pm$ 0,28	13,52 $\pm$ 2,55	<0,025
AP	246 $\pm$ 22	302 $\pm$ 65	<0,025
LAP	16,8 $\pm$ 1,5	23,1 $\pm$ 1,0	<0,025
CHE	492 $\pm$ 116	286 $\pm$ 35	N.S.

bei den alkoholgefütterten Ratten in der Leber parallel zum mikrosomalen Gesamteiweiß signifikant erhöht war (Tab. 8), fand sich bei der experimentellen Gallengangsunterbindung kein signifikanter Unterschied beider Parameter im Vergleich zwischen operierten sowie scheinoperierten Ratten (Tab. 13). Dementsprechend konnte bei letzterem Experiment die gleiche Mikrosomenausbeute von jeweils 43 % bei beiden Tiergruppen festgestellt werden.

Bemerkenswert ist, daß im Leberhomogenat der gallengangsunterbundenen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere GGT-Aktivität gefunden wurde (Tab.12), sodaß sich die Frage erhob, ob Bilirubin die GGT-Aktivität im Homogenat hemmt (10). Daher wurden *in vitro* Versuche angeschlossen, bei denen das Leberhomogenat 5 Minuten lang mit Bilirubin (0,18 mg Bilirubin; 3,21 ml Endvolumen im Test) inkubiert wurde. Dabei zeigte sich bei der Kontrollratte und der gallengangsunterbundenen Ratte eine signifikant niedrigere GGT-Aktivität unter dem Einfluß von Bilirubin (Tab. 14).

Tabelle 12 : Einfluß der extrahepatischen Gallengangs-
unterbindung auf die GGT Aktivität im Leber-
homogenat.

Die Enzymaktivitäten sind in Units/g Leber
Feuchtgewicht, Units/g Eiweiß und U/100 g
Körpergewicht berechnet. Die Ergebnisse
stammen von 12 Versuchstieren.

Gamma-Glutamyltransferase im Homogenat

	Kontrollgruppe	Gallengangs- unterbundene Gruppe	p
GGT			
(U/g Leber)	$0,72 \pm 0,16$	$0,58 \pm 0,16$	N.S.
(U/g Eiweiß)	$3,56 \pm 0,82$	$3,92 \pm 0,79$	N.S.
(U/100 g KG)	$3,13 \pm 0,66$	$2,63 \pm 0,46$	N.S.

Tabelle 13 : Einfluß der extrahepatischen Gallengangs-
unterbindung auf die Konzentration von Ge-
samt-Eiweiß und den Cytochrom P-450-Gehalt
der Rattenleber. Das Gesamt-Eiweiß ist in
g/g Leber und g/100 g KG bzw. mg/g Leber
und mg/100 g KG angegeben, das Cytochrom
P-450 in nMol/g Leber, nMol/mg mikrosomales
Eiweiß und nMol/100 g KG . Untersucht wurden
12 Ratten.

	Kontrollgruppe	Gallengangs- unterbundene Gruppe	p
<u>Cytochrom P-450</u>			
Homogenat :			
(nMol/g Leber)	26,8 $\pm$ 1,40	24,6 $\pm$ 0,87	N.S.
(nMol/100gKG)	129,7 $\pm$ 8,08	140,4 $\pm$ 3,61	N.S.
Mikrosomen :			
(nMol/g Leber)	11,3 $\pm$ 1,05	10,3 $\pm$ 0,40	N.S.
(nMol/mg Eiw.)	0,93 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,03	N.S.
(nMol/100gKG)	54,3 $\pm$ 4,87	60,0 $\pm$ 1,89	N.S.
<u>Gesamt-Eiweiß</u>			
Homogenat :			
(g/g Leber)	0,21 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	<0,025
(g/100gKG)	1,02 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,06	N.S.
Mikrosomen :			
(mg/g Leber)	12,5 $\pm$ 1,12	11,7 $\pm$ 0,26	N.S.
(mg/100gKG)	60,6 $\pm$ 15,7	67,9 $\pm$ 3,4	N.S.

Tabelle 14 : Einfluß einer in vitro Zugabe von Bilirubin auf die Aktivität der Gamma-Glutamyltransferase in der Leber.

Die Aktivität der GGT im Leberhomogenat wurde nach Zugabe von Bilirubin (0,18 mg/3,21 ml Endvolumen) gemessen und mit Kontrollinkubationen verglichen, in denen im Ansatz nur physiologische Kochsalzlösung (10 μ l) statt 10 μ l Bilirubinsuspension zugesetzt worden war. Die Ergebnisse sind in Units/g Leber(Feuchtgewicht) angegeben. Untersucht wurden 12 Tiere.

GGT Aktivität in der Leber

Inkubationsbedingungen	Kontrollratte	Gallengangs- unterbundene Ratte
keine Zugabe	0,74 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,01
+ Bilirubin	0,58 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,01
p	<0,025	<0,025

4. Diskussion

Alkoholmißbrauch kann eine Vielfalt von morphologischen und funktionellen Veränderungen im menschlichen Organismus hervorrufen. Die alkoholische Fettleber, ein im Frühstadium des Alkoholabusus gehäuft vorkommender Ausdruck der toxischen Stoffwechselstörung der Leber, ist im Prinzip reversibel sofern die auslösende Noxe Alkohol beseitigt werden kann (31). In vielen Fällen ist sie jedoch der Vorbote einer schweren Lebererkrankung, der alkoholischen Hepatitis, einer degenerativ-nekrotisierenden Leberschädigung und schließlich einer alkoholischen Lebercirrhose (32, 35). Daher ist eine frühzeitige Erkennung alkoholbedingter Leberschäden bereits im Stadium der Fettleber sowie das Aufdecken der pathophysiologischen Zusammenhänge ihrer Entstehung eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung.

Bei Erwachsenen führt chronischer Alkoholgenuß zu einer Vielzahl von Symptomen, die im Frühstadium der alkohol-toxischen Schädigungen jedoch relativ unspezifisch sind (11) und oft nicht ausreichen, die Diagnose einer alkoholischen Fettleber ohne die Hilfe einer Leberbiopsie zu stellen. Trotzdem ist es möglich, durch biochemische Untersuchungen der Enzym-Muster im Serum die alkoholische Genese der Erkrankung zu eruieren.

Die Bestimmung der Aktivität der für Lebererkrankungen typischen Serumenzyme lassen nicht nur Schlüsse auf die Herkunft der Enzyme, also die Lokalisation der vorliegenden Störung zu, sondern auch auf die Ausbreitung der Organläsion, die Ablaufgeschwindigkeit und das Stadium des pathologischen Prozesses und die Art der Zellschädigung ziehen (48). Nicht nur die absolute Höhe der Enzymaktivitäten sondern auch ihre unterschiedlichen Relationen zueinander, also das Enzym-Muster als Ganzes betrachtet, ermöglicht es, eine hochdifferenzierte Diagnostik betreiben zu können. Chronischer Alkoholgenuß bewirkt im Vergleich zu anderen bei Lebererkrankungen erhöhten Enzymen eine extrem hohe Aktivität der GGT im Serum. Unsere Studie zeigt, daß sowohl beim Menschen (Abb. 1) als auch beim Tier (Tab. 2) nach chronischer Verabreichung von Alkohol ein signifikanter Anstieg der GGT-Aktivität im Blut beobachtet werden kann. Untersuchungen über den zugrunde liegenden Mechanismus zeigten an der Rattenleber eine enge Beziehung zwischen der Aktivität im Serum und in der Leber (Tab. 2 und 3). Dabei ist die pro g mikrosomales Eiweiß erhöhte GGT (Tab. 7) Zeichen einer echten Enzyminduktion in der Leberzelle.

Drei Tage nach extrahepatischer Gallengangsunterbindung fand sich ebenso eine pro g Eiweiß signifikant erhöhte GGT-Aktivität im Leberzellplasma und den Lebermikrosomen (Tab. 10). Ein ähnlicher Mechanismus könnte demnach

bei der Erhöhung der GGT-Aktivität nach Verabreichung von Alkohol wie auch bei Cholestase zugrunde liegen.

Unsere Befunde bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (42,44,58), die ebenfalls eine Erhöhung der GGT-Aktivität im Serum bei der alkohol-toxischen Fettleber fanden. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (2, 8) wurde im Serum von Kontroll-tieren nur wenig GGT-Aktivität gefunden, während chronische Alkoholfütterung zu einer deutlichen Akti-vitätserhöhung der Serum-GGT führte (Tab.2). Neben der erhöhten Triglyceridkonzentration in Leber und Serum der alkoholgefütterten Tiere (Tab. 2 und 4) fiel die sowohl im Serum als auch in der Leber gesteigerte Akti-vität der Cholinesterase auf (Tab. 2 und 4). Als sensitives Markerenzym der Proteinsynthese in der Leber (17) ist die Serum-Cholinesterase Aktivität bei einer Proteinsyntheseeinschränkung der Leberzelle herabgesetzt (16). Umgekehrt deutet die nach chroni-schem Alkohol erhöhte Aktivität der Cholinesterase auf eine Retention von Exportproteinen hin, auf die auch Bar a n o a , L e o und B o r o w s k i ,1975, bereits hinwiesen.

Andere Enzyme wie die Transaminasen oder die Leucin-aminopeptidase und die alkalische Phosphatase zeigten nach chronischem Alkoholkonsum keine signifikanten Aktivitätsunterschiede im Serum (Tab.2). Diese Enzyme sind bei einer Leberschädigung aufgrund einer gesteig-

gerten Enzymausschüttung aus der Leberzelle im Blut vermehrt nachweisbar wie B e n g m a r k und Mitarbeiter (1967) sowie L i n d e (1958) am Beispiel der Glutamat-Pyruvat-Transaminase zeigen konnten. Für die Erhöhung der GGT-Aktivität im Serum war die Frage zunächst offen, ob ihre gesteigerte Serumaktivität (Tab. 2) auf einem Zellschaden mit einer Ausschwemmung der hepatischen GGT-Aktivität aus der nekrotischen Leberzelle beruht, oder ob ein anderer Mechanismus dafür verantwortlich ist.

Neben einer löslichen Form im Leberzellplasma fand sich eine membrangebundene Form der GGT, die in der Mikrosomenfraktion der Leberzelle nachgewiesen werden konnte (Tab. 6 und 7). Während G o l d b e r g und M a r t i n (1975) die im Leberzellplasma gemessene lösliche GGT-Aktivität auf eine zu grobe Homogenisation der Leber zurückführte, beschrieben andere Autoren (43, 53, 54), daß neben einer mikrosomalen Form der GGT auch eine lösliche Form dieses Enzyms im Zytoplasma existiert.

Dem Versuch der in vivo Applikation von Alkohol folgten Untersuchungen der mikrosomalen GGT-Aktivität in vitro nach einer Inkubation von 50 mM Alkohol. Ebenso wie Desoxycholat (37) zeigte Alkohol per se eine gewisse solubilisierende Wirkung an den mikrosomalen Membranen, wobei der Effekt nur bei den alkoholgefütterten Tieren bei Äthanolinkubation nachweisbar war (Tab. 9).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann daher der Pathomechanismus der erhöhten GGT-Aktivität nach chronischem Alkoholkonsum hypothetisch dargestellt werden (Abb. 2). Chronischer Alkoholkonsum führt dabei primär zu einer Enzyminduktion der GGT-Aktivität in den Lebermikrosomen, anschließend bewirkt die Anwesenheit von Alkohol in der Leberzelle eine partielle Solubilisierung der mikrosomalen GGT durch eine direkte Einwirkung des Alkohols auf die Mikrosomenmembran. Durch die partielle Solubilisierung kommt es zu einem passageren Anstieg der löslichen GGT-Aktivität im Zytoplasma der Leberzelle mit nachfolgendem Übertritt der Leber-GGT-Aktivität in das Blut, sodaß dann ein Anstieg der GGT-Aktivität im Blut beobachtet werden kann.

Da bei Mensch (18, 34, 52) und Ratte (Tab. 2 und 11) sowohl bei einer Cholestase als auch nach chronischem Alkoholgenuß eine gesteigerte Aktivität der Serum-GGT festgestellt werden kann, erhebt sich die Frage, ob die Ursache der erhöhten GGT-Aktivität nach chronischem Alkoholkonsum möglicherweise auf eine - wenn auch diskrete - Cholestase zurückzuführen ist. Vergleichende histochemische Untersuchungen zeigten ein ähnliches morphologisches Bild bei beiden Versuchsmodellen (23,43). Die GGT-Aktivitätserhöhung im Serum nach extrahepatischer Gallengangsunterbindung ist jedoch nicht selektiv: andere Cholestase-anzeigende Enzyme wie die alkalische

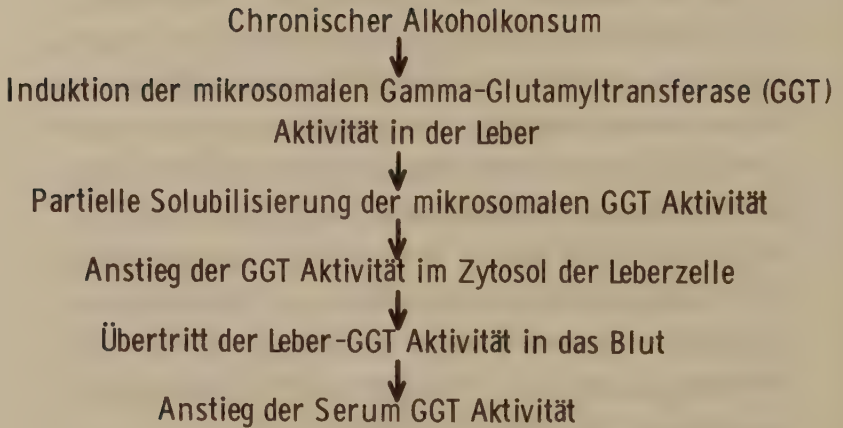


Abbildung 2 : Hypothetischer Reaktionsablauf in der Leberzelle bei einer Erhöhung der GGT-Aktivität im Serum nach chronischem Alkoholkonsum

Phosphatase und Leucinaminopeptidase, die mit der GGT-Aktivität eine enge Korrelation aufweisen, zeigten ebenfalls gesteigerte Aktivitäten im Serum der gallengangsunterbundenen Tiere (Tab. 11). Eine Zunahme der GGT-Aktivität in den Mikrosomen und im Zytosol der Leberzelle bei obstruktivem Gallengangsverschluß ging jedoch nicht mit einer gesteigerten Aktivität im Homogenat einher (Tab. 12). Dies ist mit einer Inhibition der GGT-Aktivität im Leberhomogenat durch Bilirubin zu erklären, die bereits von C o m b e s und Mitarbeitern (1977) diskutiert wurde. Bei Patienten mit akuter Hepatitis fand sich in ihren Untersuchungen mit ansteigendem Serum-Bilirubin eine umso niedrigere GGT-Aktivität im Serum (10). Aufgrund dieser Befunde und unserer Beobachtungen (Tab. 12) konnte nach einer Inkubation mit Bilirubin zum Ansatz für die GGT-Bestimmung bei gallengangsunterbundenen wie bei scheinoperierten Ratten ein signifikanter Abfall der GGT-Aktivität gezeigt werden (Tab. 14).

Bereits frühzeitig stellt sich die Leber auf die in den Organismus aufgenommene Alkoholmenge ein und reagiert mit einer adaptiven Proliferation des endoplasmatischen Retikulums in der Leberzelle (23). Gleichzeitig findet sich biochemisch neben einer Vermehrung des Gesamt-Proteins des glatten endoplasmatischen Retikulums (24) eine Induktion des Cytochrom P-450 und der mikrosomalen GGT (Tab. 7

und 8). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der chronischen Alkoholfütterung fand sich auch nach Choledochusligatur eine pro g Eiweiß erhöhte mikrosomale GGT-Aktivität (Tab. 10). Ursache für die vermehrte Aktivität der Serum-GGT wird daher bei beiden Versuchen ein Wechsel zwischen excessiv hohen Enzymen der mikrosomalen und der löslichen Form im Innern der Zelle sein, die zur Ausschüttung in das Blut führt.

5. Zusammenfassung

Nach chronischem Alkoholkonsum wurde beim Menschen als auffallendster biochemischer Befund eine meist extreme Erhöhung der Gamma-Glutamyltransferase-(GGT)-Aktivität im Serum festgestellt, während andere Serumenzyme wie die Transaminasen, alkalische Phosphatase und Leucinaminopeptidase wenn überhaupt, dann nur eine geringfügige Aktivitätszunahme aufwiesen. Tierexperimentelle Untersuchungen mit Ratten ergaben nach vier- bis fünfwöchiger Fütterung einer alkoholhaltigen Diät neben einer signifikant erhöhten Aktivität der GGT im Serum eine ebenfalls erhöhte GGT-Aktivität in der mikrosomalen Fraktion der Leberzelle der alkoholgefütterten Ratten. Diese Erhöhung der hepatischen mikrosomalen GGT-Aktivität berechnet pro mg mikrosomales Eiweiß spricht für eine alkoholbedingte mikrosomale Enzyminduktion in der Leberzelle. Der zugrunde liegende Mechanismus führt möglicherweise über eine durch Alkohol bewirkte partielle Solubilisierung der membrangebundenen mikrosomalen GGT zu einem verstärkten Übertritt dieses Enzyms zunächst in das Zellplasma und dann in das Blut. Ähnliche Befunde wie bei der chronischen Alkoholfütterung zeigten sich drei Tage nach extrahepatischer Gallengangsunterbindung bei Ratten. Bei dieser Untersuchung war die GGT-Aktivität bezogen auf U/g Leber

Feuchtgewicht, U/100 g Körpergewicht und U/mg mikrosomales Eiweiß parallel zur GGT Aktivität im Serum bei den gallengangsunterbundenen Tieren signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Ein ähnlicher Mechanismus könnte demnach bei der Erhöhung der GGT-Aktivität nach chronischem Alkoholkonsum wie auch bei Cholestase zugrunde liegen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adjarov, D., Popov, S., Ivanov, E. :
Studies on the mechanism of the changes in serum and liver γ -glutamyl transpeptidase activity.
I. Experimental extrahepatic cholestasis in rabbits.
Enzyme 21 : 1-7 (1976)
2. Albert, Z., Rzuclidlo, Z., Starzyk, H. :
Comparative biochemical studies on the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in the organs of fetuses, newborns and adult rats.
Acta histochem. Jena 37: 34-39 (1970)
3. Baranoa, E., Leo, M. A., Borowski, S. A. :
Alcohol hepatomegaly : Accumulation of protein in the liver.
Science 190: 794-795 (1975)
4. Bengmark, S., Ekholm, R., Olsson, R. :
Transaminase activity in subcellular fractions of normal and regenerating rat liver.
Acta Hepatosplenol. 14 : 80-88 (1967)
5. Bergmeyer, H. U., Bernt, E. :
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.
in : Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim 769-775 (1974)
6. Bergmeyer, H. U., Bernt, E. :
Glutamat-Pyruvat-Transaminase.
in : Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim 717-723 (1970)
7. Börnig, H., Stepan, J., Horn, A., Giertler, R., Thiele, G., Vecerek, B. :
Intrazelluläre Verteilung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase der Rattenleber und ihr Verhalten nach Unterbindung des Ductus Choledochus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 : 1311-1318 (1967)

8. Colombo, J. P., Bircher, J. :
Acquisition of an embryonal biochemical feature in the rat liver after portocaval shunt.
Experientia 29: 1232-1233 (1973)
9. Coltorti, M., Simone, A., Cesare, D., Rinaldi, M. :
Effect of Phenobarbital administration on liver and plasma Gamma-Glutamyl-Transpeptidase : Clinical and experimental investigations.
Acta Vitaminol. Enzymol. 27 : 217-222 (1973)
10. Combes, B., Shore, G.M., Cunningham, F. G.,
Wacker, F. B., Shorey, J. W., Ware, A. :
Liver physiology and disease.
Serum Gamma-Glutamyl Transpeptidase activity in viral hepatitis : suppression in pregnancy and birth control pills.
Gastroenterology 72 : 271-274 (1977)
11. Coppo, M., Manenti, F., Carulli, N. :
Klinik der Alkoholfettleber.
in : Gerok, H., Hennekeuser, H. H., Sickinger, K. : II. Internationales Freiburger Leber-Symposium. Alkohol und Leber. 2.-4. Oktober 1970
Kongressbericht Dr. Falk 1 : 145-153 (1970)
12. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie : Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8 : 658-660 (1970)
13. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie : Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten.
Experimentelle Begründung der optimierten Standard-Bedingungen
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10 : 182-192 (1972)
14. DeCarli, L.M., Lieber, C. S. :
Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet.
J. Nutr. 91 : 331-336 (1967)
15. Dixon, T. F., Purdom, M. :
Serum 5'nucleotidase.
J. Clin. Pathol. 7: 341-343 (1954)

16. Gibinski, K., Grzybek, H., Zmudzinski, J. :
The occurrence of γ -Glutamyl Transpeptidase in the human liver under normal and pathological conditions.
Acta Med. Pol. 4: 341-350 (1963)
17. Goldberg, D. M., Martin, J. V. :
Role of γ -Glutamyl Transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease.
Digestion 12 : 232-246 (1975)
18. Greim, H. :
Synthesesteigerung und Abbauehemmung bei der Vermehrung der mikrosomalen Cytochrome P-450 und b-5 durch Phenobarbital.
Arch. Pharmak. 266 : 261-275 (1970)
19. Greim, H., Schenkman, J. B., Klotzbücher, M.,
Remmer, H. :
The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b-5 and cytochrome P-450 in the rat.
Biochem. Biophys. Acta 201 : 20-25 (1970)
20. Hanes, C. S., Hird, F. J., Isherwood, F. A. :
Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione.
Nature 166 : 288-292 (1950)
21. Hausamen, T.U., Helger, R., Rick, W., Gross, W. :
Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method.
Clin. Chim. Acta 15 : 241-245 (1967)
22. Iseri, O. A., Gottlieb, L. S., Lieber, C. S. :
The ultrastructure of ethanol induced fatty liver.
Federation Proc. 23 : 579 (1964)
23. Iseri, O. A., Lieber, C.S., Gottlieb, L. S. :
The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion.
Am. J. Pathol. 48 : 535-545 (1966)
24. Ishii, H., Joly, J. G., Lieber, C. S. :
Effect of ethanol on the amount and enzyme activities of hepatic rough and smooth microsomal membranes.
Biochem. Biophys. Acta 291:411-420 (1973)

25. Ivanov, E., Krustev, L., Adjarov, D., Chernev, K.,
Apostolov, D., Dimitrov, P., Drenska, E.,
Stefanova, M., Pramatarova, V. :
Studies on the mechanism of the
changes in serum and liver γ -gluta-
myl transpeptidase activity.
II. Experimental Hexachlorobenzene
porphyria in rabbits.
Enzyme 21 : 8-20 (1976)
26. Kato, R. : Possible role of P-450 in the
oxidation of drugs in liver micro-
somes.
J. Biochem. 59 : 574 -583 (1966)
27. Knedel, M., Böttger, R. :
Eine kinetische Methode zur Bestim-
mung der Aktivität der Pseudocholin-
esterase (Acylcholin-acylhydrolase
3.1.1.8).
Klin. Wschr. 45 : 325-327 (1967)
28. Kokot, F., Grzybek, H., Kuska, J. :
Experimental studies on γ -Gluta-
myl Transpeptidase (GGTP).
IV. Histoenzymatic and biochemical
changes in rabbits and in obstruc-
tive jaundice in dogs.
Acta Med. Pol. 6 : 379-388 (1965)
29. Lartillot, S., Vogel, C. :
Dosage des Triglycerides sériques.
Feuilletts De Biologie XI : 39-42
(1970)
30. Lauter, C. J., Solyom, A., Trams, E. G. :
Comparative studies on enzyme
markers of liver plasma membranes.
Biochim. Biophys. Acta 266 :
511-523 (1972)
31. Leevy, C. M.: Therapie der Alkoholfettleber und
Hepatitis.
in : Gerok, H., Hennekeuser, H. H.,
Sickinger, K. : II: Internationales
Freiburger Leber-Symposium. Alkohol
und Leber. 2.-4. Oktober 1970
Kongressbericht Dr. Falk 1 : 192-
193 (1970)
32. Lieber, C. S., DeCarli, L. M., Rubin, E. :
Sequential production of fatty
liver, hepatitis, and cirrhosis
in subhuman primates fed ethanol
with adequate diets.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72:
437 (1975)

33. Linde, S. : A comparison between the enzyme patterns (G0-T, GP-T, LDH) in serum and tissue extracts in cardiac and hepatic diseases.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10: 303-307 (1958)
34. Lukasik, S., Richterich, R., Colombo, J. P. : Der diagnostische Wert der alkalischen Phosphatase, der Leucinaminopeptidase und der γ -Glutamyl Transpeptidase bei Erkrankungen der Gallenwege.
Schweiz. med. Wschr. 98 : 81-83 (1968)
35. Maier, K. P., Seitzer, D., Haag, G., Peskar, M., Gerok, W. : Histologische und laborchemische Verlaufsbeobachtungen bei Patienten mit alkoholischer Hepatopathie.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 84: 1087-1090 (1978)
36. Mayr, K. : Die Gamma-Glutamyltranspeptidase in der klinischen Diagnose.
Wiener klin. Wschr. 85 : 83-87 (1973)
37. Meister, A. : Biosynthesis and utilization of glutathione ; the γ -glutamyl cycle and its function in amino acid transport.
in : Flohé, L., Benöhr, H.C., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. : Glutathione.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 56-69 (1974)
38. Müller, E., Colombo, J.P., Peheim, E., Bircher, J.: Histochemical demonstration of gamma-glutamyltranspeptidase in rat liver after portocaval anastomosis.
Experientia 30 : 1128-1129 (1974)
39. Nagel, W., Willig, F., Schmidt, F.H. : Über die Aminosäurearylamidase- (sog. Leucinaminopeptidase-) Aktivität im menschlichen Serum.
Klin. Wschr. 42 : 447-449 (1964)

- 40 . Omura, T., Sato, R. :
The carbon monoxide-binding pigment
of liver microsomes.
I. Evidence for its hemeprotein
nature,
J. Biol. Chem. 239 : 2370-2378
(1964)
- 41 . Orlowski, M., Szewczuk, A. :
A note on the occurrence of gamma-
glutamyl transpeptidase in human
serum.
Clin. Chim. Acta 6 : 430-432
(1961)
- 42 . Rollason, J. G.: Serum gamma glutamyl transpepti-
dase in relation to alcohol
consumption.
Clin. Chim. Acta 39: 75-80 (1972)
- 43 . Ronchi, G., Ideo, G. :
Ethanol increased liver gamma-
glutamyl transpeptidase.
11. Meeting of the European
association for the study of the
liver.
Digestion 14 : 455 (1976)
- 44 . Rosalki, S. B., Rau, D. :
Serum γ -glutamyl transpeptidase
in alcoholism.
Clin. Chim. Acta 39 : 41-47 (1972)
- 45 . Rubin, E., Hutterer, F., Lieber, C.S. :
Increase of hepatic smooth endo-
plasmic reticulum and drug meta-
bolizing enzymes induced by ethanol.
Science 159 : 1469-1470 (1968)
- 46 . Rutenburg, A. M., Golbarg, J. A., Pineda, E. P. :
Serum gamma-glutamyl transpepti-
dase activity in hepatobiliary
pancreatic disease.
Gastroenterology 45 : 43-48 (1963)
- 47 . Scherberich, J. E., Falkenberg, F. W., Mondorf, A.W.,
Müller, H., Pfeiderer, G. :
Biochemical and immunological
studies on isolated brush border
membranes of human kidney cortex
and their membrane surface pro-
teins.
Clin. Chim. Acta 55 : 179-197
(1974)

48. Schmidt, E., Schmidt, F. W. :
Enzym-Muster.
Diagnostik 8 : 427-432 (1975)
49. Szasz, G. : A kinetic photometric method for
serum gamma-glutamyl transpeptidase.
Clin. Chem. 15 : 124-136 (1969)
50. Szasz, G., Rosenthal, P., Fritzsche, W. :
Die gamma-Glutamyl-Transpeptidase-
Aktivität im Serum bei hepatobili-
ären Erkrankungen.
Dtsch. med. Wschr. 94 : 1911-1917
(1969)
51. Szasz, G. : Gamma-Glutamyltranspeptidase-Akti-
vität im Urin.
Z. klin. Chem. 8 : 1-8 (1970)
52. Szczeklik, E., Orlowski, M., Szewczuk, A. :
Serum Gamma-Glutamyl Transpeptidase
activity in liver disease.
Gastroenterology 41 : 353-359
(1961)
53. Szewczuk, A., Baranowski, T. :
Purification and properties of
gamma-glutamyl transpeptidase
from beef kidney.
Biochem. Z. 338: 317-329 (1963)
54. Szewczuk, A. : A soluble form of gamma-glutamyl
transpeptidase in human tissues.
Clin. Chim. Acta 14 : 608-614
(1966)
55. Teschke, R., Hasumura, Y., Lieber, C. S. :
Hepatic microsomal alcohol oxi-
dizing system; affinity for metha-
nol, ethanol, propanol, and butanol.
J. Biol. Chem. 250 : 7397-7404
(1975)
56. Wahlefeld, A. W. : Triglyceride. Bestimmung nach
enzymatischer Verseifung.
in : Bergmeyer, H. U. : Methoden
der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim II : 1878-
1882 (1974)
57. Weichselbaum, T. E. : An accurate and rapid method
for the determination of proteins
in small amounts of blood serum
and plasma.
Amer. J. Clin. Pathol. 16: 40-49 (1946)

58. Zein, M., Discombe, G. :

Serum gamma-glutamyl transpeptidase
as a diagnostic aid.

Lancet 2 : 748-750 (1970)

Mein besonderer Dank gilt :

Herrn Professor Dr. G. Strohmeier für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung sowie die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit;

Herrn Professor Dr. F.K. Ohnesorge für die freizügigen Arbeitsbedingungen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie und Herrn Professor Dr. P. Naumann für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie;

Herrn Dr. Teschke für das ständige Interesse und die wertvolle Hilfe bei der Planung und Durchführung der Studien;

den Mitarbeiterinnen Frau H. Gohl und Frau A. Willigens für Ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

Lebenslauf

Ich, Angelika Brand, wurde als Tochter des Ehepaares Josef Brand und Ehefrau Katharina, geb. Hahn, am 13.12.1954 in Grevenbroich geboren.

Von meinem sechsten bis zu meinem zehnten Lebensjahr besuchte ich die Grundschule in Grevenbroich-Elsen.

1964 wechselte ich zum Gymnasium Marienberg Neuss über und bestand dort 1973 mein Abitur.

Im Oktober 1973 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Düsseldorf. Hier leistete ich in der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinik D, in der Chirurgischen Klinik und in der Augenklinik der Universität Düsseldorf mein Praktisches Jahr ab.

Den schriftlichen Teil des dritten Abschnitts des medizinischen Staatsexamens legte ich am 15.10.1979, den mündlichen Teil des dritten Abschnitts am 12.11.79 ab.

Am 3.12.1979 habe ich mit meiner Tätigkeit als Wissenschaftliche Angestellte in der Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinik D, der Universität Düsseldorf begonnen.

Angelika Brand

